

**INJECTABLE OPACIFYING LIPOSOME COMPOSITION****Publication number:** JP2500192T**Publication date:** 1990-01-25**Inventor:****Applicant:****Classification:****- international:** **A61K9/127; A61K49/04; A61K9/127; A61K49/04;**
(IPC1-7): A61K9/127; A61K49/04**- European:** A61K49/04H8F2**Application number:** JP19880504697 19880516**Priority number(s):** CH19870001991 19870522**Also published as:**

WO8809165 (A1)



EP0314764 (A1)



US5312615 (A1)



ES2009917 (A6)



EP0314764 (A0)

more >>

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP2500192T

Abstract of corresponding document: **WO8809165**

Injectable aqueous composition intended for opacifying certain organs with a view to examination by X-rays. This composition is based on liposomes containing, encapsulated therein, an aqueous solution of an iodinated opacifying agent. The ratio between the weight of iodine encapsulated by the liposomes and the weight of the lipids from which their membrane is formed is not lower than 1.5 mg/mg.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報 (A)

平2-500192

⑬ 公表 平成2年(1990)1月25日

⑭ Int. Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 審査請求 米請求
A 61 K 49/04 9/127 A 7417-4C 予備審査請求 米請求 部門(区分) 3(2)

(全 9 頁)

⑯ 発明の名称 X線検査用の高封入容量のリボソームを含有する注射可能な不透明組成物

⑰ 特 願 昭63-504697

⑱ 特許文書提出日 平1(1989)1月20日

⑲ 出 願 昭63(1988)5月16日

⑳ 国際出願 PCT/EP83/00447

㉑ 国際公開番号 WO88/03165

㉒ 国際公開日 昭83(1988)12月1日

優先権主張 昭1987年5月22日⑳ スイス(CH) ㉓ 01991/87-3

㉔ 発 明 者 シュナイダー ミシエル スイス国、ツエーバー・1250 トロワネ、ルート グネスイ、34、
ドメヌ デュ ムーラン

㉕ 出 願 人 ブラウコ インダストリア イタリア国、イ・20134 ミラノ、ピア エジディオ フォウリ 5
キミカ ソチエタ ベル アツ 0
イオニ

㉖ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外3名

㉗ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BB, BE(広域特許), BG, BJ(広域特許), BR, CF(広域特許), CG(広域特許), CH(広域特許), CM(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GA(広域特許), GB(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KP, KR, LK, LU(広域特許), MC, MG, ML(広域特許), MR(広域特許), MW, NL(広域特許), NO, RO, SD, SE(広域特許), SN(広域特許), SU, TD(広域特許), TC(広域特許), US

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

1. X線検査用に装置を不透明にするために開発された注射可能な水性組成物であって、脂質膜を有するリボソーム小胞の物理的に許容できる水性媒質中の懸濁液の形をとり、該小胞はその中に封入された水溶液性X線に対して不透明な少なくとも1つのヨウ素化された有機化合物を含有し、該リボソームの小胞が0.15〜3μである平均サイズを有し、そして前記膜の脂質の重量に対する該リボソーム小胞中に封入されたヨウ素の重量が1.5〜6g/gであることを特徴とする組成物。

2. 検射中の範囲における粒子のサイズの多分散度が4よりも高くないことを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

3. 前記水性媒質中に懸濁している脂質の濃度が20〜60g/gであり、その粘度が30mP.s.を超えないことを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

4. 水性媒体中の溶液としてX線に対する少なくとも1つの不透明剤を、封入された形態において含有する脂質膜の小胞を含んで成るリボソームの水性懸濁液の封入容量を増加せしめる方法であって、前記水性媒体中に懸濁しているリボソームを、0.4〜3μの範囲の孔径を有する濾過膜を通して押出し、前記膜の孔のサイズに相当する径の範囲内に前記小胞のサイズを“標準化”するようにすることを特徴とする方法。

5. 押出しによる標準化の後で前記小胞の多分散指数が4よりも高くないことを特徴とする、請求項4に記載の方法。

6. “標準化された”リボソームの懸濁液を、前記水性媒体の前記小胞を分離または濃縮するために超遠心または限界速度にかけ、次いでこうして分離または濃縮された該小胞を、溶解されているヨウ素の存在しない新しい分散媒質中に再懸濁せしめることを特徴とし、この操作の結果、封入されていないヨウ素の割合を減少せしめることになる、請求項4に記載の方法。

7. 標準化の後、該リボソーム小胞の少なくとも70%のサイズが0.2〜2μであることを特徴とする、請求項4に記載の方法。

8. “標準化された”リボソームの懸濁液をミクロフィルトレーションにかけることを特徴とし、この操作の結果、サイズが前記の範囲より下であるリボソームの懸濁液を排除し、さらに水性懸濁液の封入されていないヨウ素の濃度を減少せしめることになる、請求項4に記載の方法。

9. 該リボソームの膜を構成している脂質の転移温度よりも高い温度において操作を行うことを特徴とし、これら条件の結果、封入されたヨウ素の濃度を増加せしめることになる、請求項4に記載の方法。

10. 凍結温度が50〜90℃であることを特徴とする、請求項4に記載の方法。

11. 前記ヨウ素化された有機化合物が、イオパミドール、イオプロロール、イオヘキサール、イオペンツール、イオブロミド、イオシミド、イオベルゾール、イオトロラン、イオクスル、イオグロツノール、イオデシセル、1、3-ビス-

特表平2-500192(2)

明 細 書

(N-8,5-ビス-(2,3-ジヒドロキシプロピル)アミノカルボニル)-2,4,6-トリメトキシフェニル)-N-ヒドロキシセチル-アミノ)-プロパンから選択されることを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

12. 前記脂質が、加水分解されたダイズのレンチン、ジパルミトイル-ホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイル-ホスファチジルコリン(DSPC)、スフィンゴミエリン(SM)、ジセチル-ホスフェート(DCP)、ジパルミトイル-ホスファチジルグリセロール(DPPG)およびジパルミトイル-ホスファチジル酸(DPPA)のうちの1つまたは複数から選択されることを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

X線透過性の高封入容量のリボソームを含有する注射可能な不透明組成物

本発明は、患者の腫瘍系に注射することのできる水性組成物に関し、その目的はX線による診断的検査のために癌の腫瘍を不透明化する(specific)ことである。この組成物は、生化学上許容される水性溶液中の、リン脂質膜を有する小胞としてのリボソームの懸濁液の形をとり、これら小胞中にはX線に対して不透明である少なくとも1つのヨウ素化された化合物の水性溶液が封入されて含まれている。

研究すべき癌の腫瘍系への放射線スコープ検出用の不透明剤の輸送のためにベクターとしてリボソームの懸濁液を利用することは知られている。例えば、US-A-4,192,859の明細書は、レンチンおよびステロールから構成される器容、特に癌内皮および心臓血管系に関連する器容の検出並びにリンパ管造影検査のための造影剤を約20〜60重量%含有するリボソームの懸濁液を記載している。そのような造影剤の中で、次のような化合物が本明細書において言及される。

N, N'-ビス-(2-ヒドロキシ-1-(ヒドロキシメチル)-エチル)-5-[(2-ヒドロキシ-1-オキソプロピル)-アミノ]-2,4,6-トリメトキシ-3-ベンゼン-ジカルボキシアミド(イオバミドール)；メトリザミド；ジアトリゾイン酸；ジアトリゾエートナトリウム；メグルミンジアトリゾエート；アセトリゾイン酸およびその塩類

塩；ジプロトリゾイン酸；ヨードミド、ヨージバミドナトリウム、メグルミンヨージバミド、ヨード尿酸およびその可溶性塩；ヨードメタム酸；ヨードピラセトヨード-2-ピリドン-N-酢酸、2,5-ジヨード-4-ピリドン-N-酢酸(ヨードピラセト)；前記のジエチルアンモニウム塩；イオグラム酸；メトリゾイン酸およびその塩；イオバノ酸、イオセラム酸、イオフェノキシ酸およびそれらの可溶性塩；チロバノエートナトリウム、イオバゴートナトリウムおよび他の同様なヨウ素化された化合物。本明細書に従って扱われるリボソームの脂質膜は、主としてリン脂質、ステロール、レンチン、ジセチルホスフェートまたはステアリン酸、および有機酸を含む。本明細書によれば特に、そのようなリボソームは、選択された脂質成分を有機酸、例えばクロホルム、ジクロロメタン、エチルエーテル、塩化炭素、酢酸エチル、ジオキサン、THF等と共に容器中で混合することにより調製される。揮発性化合物を減圧下で蒸発せしめた後、脂質混合物を、正確に計った量の不透明剤を含有する緩衝液中に分散させる。次いで全体を数時間攪拌し(これがリボソームの形成を引き起こす)、そうして生成したリボソームの小胞にその分散液の一部(不透明剤を含む)を封入する。次に、それらリボソームのサイズおよび分散液の粘度を減少させるために、分散液を緩衝液処理する。

不透明剤を含むリボソームの調製に関する他の文献もある。

例えば、FR-A-2,561,101の明細書は、X線の不透明剤を含有することのできるリボソームの調製方法を記載している。

この調製法によれば、まず第一に有機溶液中でリボソームの“前駆体”が調製され、次いでそれから該溶液を部分的に分離し、一部分の脂質を含んでいるこの溶液を、緩衝液の単分子膜を二分子膜に変換するために応用する。次にこの溶液を水性緩衝液中に分散せしめ、そして残った溶液を完全に取り除く。

US-A-4,567,033の明細書は、X線不透明剤およびコントラスト生成物のベクターとしてのリボソーム中へのその取り込みを記載している。

GB-A-4,134,669の明細書は、リボソームの調製のための技術を記載しており、これによれば、水溶性のキャリア剤(KCl、サッカロース、ラクトース等)の粒子(10 μ m)を同視線性剤でコーティングし、次なる緩衝液の水性溶液中への分散でリボソームを生ぜしめる。該コーティングは、該脂質および封入されるべき生成物(その中にX線造影剤が見出される)の有機溶液中に該キャリアの固体粒子を分散させることにより行われる。同視線性剤の中で、飽和された合成レンチンを言及することになっている。

GB-A-2,135,268の明細書もまた、水溶性のキャリア剤の粒子から出発する、不透明剤を含み得るリボソームを形成せしめるための方法を記載している。

GB-A-2,135,647の明細書は、キャリア材料の粒子が不溶性であるという意を除けば上記の2つの明細書のもものと酷く類似しているリボソームの調製方法を記載している。この中に含まれるものは、ガラスの微小球または合成樹脂である。

特表第2-500192 (2)

る。該粒子は、それらを溶質および所望によりイオン性界面活性剤またはコレステロールを含む有機溶媒と溶解させ、その操作に続いて蒸発せしめることにより、それら成分を含むフィルムでコーティングされる。その後、封入すべき水溶性媒質、より特定のにはX線不透明剤を含むものの中でそれら球体を構構し、次いで遠心または遠心により後者を分離せしめることにより、所望のリボソームの選別が得られる。

GB-A-2,150,345の明細書は、X線造影剤としてのトリオード安息香酸のジアセチルアミノ化合物およびそのリボソーム内への取り込みを記載している。

GB-A-2,157,283の明細書は、上記刊行物のものに類似した化合物および20-60%の量におけるそのリボソーム内への取り込みを記載している。後者は、US 3,957,971の明細書に記載されている同製法と一致している。

EP-A-129,689の明細書は、リボソームの懸濁液の製法方法を記載しており、これによれば、封入すべき生物活性物質を脂質の存在下で有機溶媒中に分散せしめ、ゲルの形成が起こるまで溶液を蒸発せしめ、そしてこのゲルを次の緩衝化水性溶液中に再懸濁する。各成分の量および操作条件の適切な選別により、リボソーム小胞の非常に高濃度の封入および溶液中に均質な分布をもたらす。

リボソームに関する他の最近の文献の中で、コントラスト生成物のベクターとして、それらは言及されるかもしれない：A. HARBURGら、*Radiology*(1981) 140, 507; P. J. RYAN ら、*Biochem. Biophys. Acta*(1983) 758, 108; S. B. SBLTZERら、

Lab(1984) 123, 375; P. J. RYAN ら、*Radiology*(1984) 152, 759; B. A. ROZENBERG, *Radiology*(1983) 148, 877; S. REHITA ら、*J. Pharm. Sci.*(1984) 73, 1751; R. F. CHENG ら、*Investigative Radiology*(1987) 22, 47-55; H. X. ZALUTZKY ら、*Investigative Radiology*(1987) 22, 141-147。

前述の文献中に開示された前記技術は、実験的な試験においてはよく実行されるけれども、幾つかの実際の問題に実用面で解決すべきことが残った。

従って、不透明剤を含有するリボソーム小胞は最終的に肝臓および脾臓に定着するけれども、循環系におけるそれらの消失と併に、脂肪代謝の危険を有する肝の毛細血管により保持されることも可能である。さらに、実際のリボソームのヨウ素化生成物の体積および質量での封入の比率は、比較的小さく（通常、脂質1g当り1g程度のヨウ素）、そしてこれは所望の造影効果を増大するために比較的多量の脂質の注入を要する。この問題に関しては、このヨウ素は明らかに有機分子に結合しているけれども、実際問題として、脂質1g当りのヨウ素のgとしての封入されにヨウ素の量によりリボソーム懸濁物を特徴づけるのが常であるということに注意する。X線を使う検査に必要なヨウ素の量に関しては、肝臓の不透明化には通常1g当り2-3.5mgのオーダーのヨウ素濃度、即ち約8g（肝臓の重さ約2.3kg）を必要とすることが認められる。注入されたリボソームの約40%だけが肝臓中に保持されるという事実を考慮すると、最少で15gのヨウ素を投与することが必要である。1の1/1比のためには

（当技術の現状では高い値）これは15gの脂質に相当し、既にかなりの用量を構成する。このことから明かなように、主な制限点はリボソームの封入容量を増加せしめることである。

例として、Y. J. GARBER, *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*(1985), 1, 121-153によれば、膜が「小さい単一層板の(unilamellar)小胞(SUV)」として定義している、直径0.02-0.5μmを有するクラスのリボソームの封入容量は、0.2-1.5g/gのオーダーであり、これは約800の平均分子量（リン脂質）だとしても、約1-2mg/gリン脂質の封入容量に相当する。例えば、ヨウ素300mg/mlのオーダーの不透明化溶液を封入する場合に、1/1比ができれば1.5の値を超えるように、この容量を5mg/gまたはそれより高く上げることが望まれる。

さらに、懸濁力を有する本発明のリボソームの懸濁液により含まれるヨウ素のかなりの部分が水性分散相中に溶解されておりそして該小胞内に封入されない（例えば、US-A-4,192,439を参照のこと）。そういった状況は望ましくないということがわかるだろう。何故なら、診断目的での注射の時に、封入されていないヨウ素の部分が検査すべき器官中に固定されずそして全く有用な同様に役立つからである。結果として、無駄にヨウ素を注入しなければならぬことを避けるために、できる限りこの封入されない部分を減らし得るのが望ましい。

請求項1に記載された組成物は、封入力の欠陥の欠点を克

服することを可能にする。実際、実験の際に、本発明者らは、驚くべきことにリボソームの溶液の小胞のサイズをある程度の範囲内に「標準化する」ことにおいて、即ち、0.15μm以下または0.1μm以上の寸法を有する小胞の大部分を、押出しによってサイジングすることにより排除することにより、そして好ましくは0.2-1μmのサイズに小胞の大部分を維持することにより、封入されるヨウ素の量が幾分か増加することを確証した。この効果は、該小胞の比封入容量（即ち、小胞の膜の脂質の重量に對する封入された液体の体積）の増加の結果であり、ある場合にはこの比が10-15mg/g脂質に達することが可能である。

加えて、そして他の有利な特徴を構成して、該リボソームをサイジングする方法は肝の毛細血管におけるリボソームの保持の問題をかなり除去することを可能にし、この器官において検出可能なそのようなリボソームの割合は、大きいサイズのリボソーム、例えば2-3μmを超えるものを除去したと大に減少する。標準化により、ここに特記するつもりなのは、サイズに依じた粒子の統計的分布の基準に従って、標準化の操作が前記小胞の分布曲線の収縮をもたらすことを言いたいということである；従って、本発明においては、それらの多分散度の指数が4よりも低くなく、そして好ましくは、リボソームの溶液の小胞の総数の70%以上のサイズが0.2-2μmである。

上記の発見のためにそして請求項1に記載の封入溶液中に溶解されるヨウ素化された不透明化合物の適当な選択により、

特表平2-566192 (4)

請求項2・3および11に記載の不透明組成物を容易に除去することができる。また、そのような組成物をある適量な処理（洗浄）にかけることにより、水性懸濁液中に溶解されたヨウ素の大部分を容易に除去した。本発明に係る組成物の粘度（ある完成の形態においては、37℃で3よりも低いまたは20〜30mPa・s. のオーダーであろう）が、従来技術による懸濁液のそれ（例えば、US-A-4,192,850の明細書中に記載の懸濁液は、6リ％のヨウ素含量について、数百のmPa・s. の粘度に達する）よりも低いことにも注目すべきであろう。リポソームの懸濁液の粘度は、脂質のレベルを下げた時に減少し、そして1/1比を一定に保つためにそれら後者の封入容量を同程度に増加せしめることが必要であるということが実験に明らかである。

さらに、ヨウ素化された不透明剤の存在は、懸濁液の粘度を引き上げることに寄与し（例えば、1リットル当りヨウ素300gのイオノミドールの水溶液は、20℃で8.8mPa・s. および37℃で4.7mPa・s. の粘度を有する）、そしてリポソームの分散相中の被ヨウ素化された化合物の濃度のどのような減少でもこの粘度を低下せしめる一助となるだろう。

本発明に係る組成物のリポソームの脂質濃度は、リポソーム懸濁液の通常粒子において通常に使われる両親水性の化合物から構成されてもよい。そのような化合物は、前述の引用文献中に記載されている。リン脂質、例えば大豆の加水分解されたレシチン（例えば、Hattemann Chemie のPC-255 製品）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジステアロ

イルホスファチジルコリン（DSPC）、スフィンゴミエリン（Sph）ジセチルホスファート（DCP）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）およびジパルミトイルホスファチジル酸（DPPA）を使うのが好ましい。リポソームの媒体における通常のやり方（cf. 導入部において引用した参考文献）とは反対に、本発明において使用される脂質の中にはコレステロールを用いることは好ましくなく、これはそれらの安定化には必須でない。分散相中に含まれる脂質の割合は、通常0.1〜10％のオーダー、好ましくは約2〜6％である。脂質に対する封入された液体の割合（v/v比）は、5ml/g以下ではなくそして特別な場合には20ml/gに達するだろう。好ましくは、それは5〜15ml/gであり、そして最も好ましいのは7〜12ml/gである。

X線に対して不透明であるヨウ素化された有機化合物として、前述の引用文献から知られる化合物のほとんどを雇用することが可能である；しかしながら、ある不透明剤は、リポソーム小胞中へのそれらの水溶液の封入容量および保管中の微小粒の安定性の点で他のものよりも適する。実際、溶液中での不透明剤の残存率は、リポソームの形成時に他のものよりも封入されにくく、そしてさらに、それらの残存率は他のものよりも保管または取扱い時にリポソーム膜の外側に凝集しやすい。

この項中で、不透明剤として、トリヨード炭素酸から誘導されるイオン性の造影剤、例えばジアトリゾイン酸のナトリウム塩および／またはメグルミン塩、および好ましくは非

イオン性造影剤、例えば非限定的例として与えられるイオノミドールまたはイオノブローールを使用するのが好ましい。造影剤は、100〜450gのヨウ素/1、好ましくは250〜350g/1の濃度を有する水溶液の形で提供される。そのような溶液、および本発明に係る組成物を使って、6gのヨウ素/1gリン脂質に及ぶであろう封入されたヨウ素量が得られる。

一般に、本発明の組成物を用いると、リポソーム小胞により占有される体積は懸濁液全体積の約5〜80％を示し、そしてある特別な場合にはそれらの数値を超えるかもしれない（70〜80％まで）。

本発明に係る組成物を調製するため、即ちリポソーム小胞の封入容量を増加せしめるため、そして例えば、リポソーム「この小胞は15gのヨウ素/g脂質（v/v）より多くの不透明水性媒体を封入する力をもったリン脂質膜を有する」の水性懸濁液を提供するための方法は、それらの小胞のサイズを標準化すること、即ち選ばれた範囲内にサイズが含まれる小胞の“重要な部分”を選択しそして他のものを排除すること、またはある程度により従って（他のもの）を、選ばれた範囲に相当する直径を有する狭い小胞に転換することである。リポソームのサイズの標準化に関して“重要な部分”という言葉により、回折分光分析により粒子の直径および粒子の分布を測定する時に使われる多分散係数Pの概念を意味する。【COLTHER Nano-Size装置（商標登録）】を用いるための取扱説明書—COLTHER ELECTRONICS LTD., Great

Britain を参照のこと）。P値のスケールは、0〜10の範囲である。1の値は単分散の粒子に相当する。例えば、8の値は、最大と最小の粒子の寸法の比が約4であることを示す。

また、粒子の分布曲線の広がりWを計算することを可能にする。係数W、即ちそれらの大部分の寸法の範囲は、 $W = d_w$ （ここで d_w は該装置により与えられた粒子のサイズである）の關係に従って、250nmより大きい粒子については5で、そして100〜250nmの粒子については4でPを割ることにより与えられる。本発明においては、多分散度の値を指数Pと等号とし、そして4に等しいかまたはそれより小さいPの値については粒子の大部分が測定されたサイズに相当するとみなされる。

従って、請求項4に記載された方法は、請求項1に定義されたような組成物に到達するための手段を説明している。小胞の大部分が約0.15〜3μm、特に0.2〜1μmのサイズを有し、特に高い封入容量を有するということが実験に確認された。“大部分”という言葉により、少なくとも70％の該リポソーム小胞が選択された範囲に適合する直径を有するという事実を示したいと思う。

この範囲内に含まれるリポソーム小胞が何故そのような高い容量を統合する能力があるかの正確な理由は明らかになっていないが、次のような議論を提出することができる。第一に、この限界より下のリポソームは不適合な体積/面積の比を有し（実際、容量が減少すればするほど、この比は小さくなる）、そして第二に、約2μmを超える微小胞はしばしば多

特表平2-500192 (5)

層状膜 (lamellar) であり、そして結果として与えられた容量に對するそれらの膜の分子量が大きすぎる。正確に寸法調節された膜を通した押出しにより、多層膜状のリボソームが少なくとも部分的に、単層膜 (monolamellar) の膜を有する小さいリボソームに再配列される；これらの「再配列された」リボソームの大部分は、本発明に係る組成物に適する最適寸法に相當する。

一般に、リボソームの溶液の標準化は、圧力下で透過膜を押し通すことにより行われる。この「押し出し」に利用される圧力は、1 bar と数 bar の少しの間で異なるであろう。好ましくは、約 0.4 ~ 2 bar の圧力を有する膜については、0.5 ~ 1.0 bar の押し出し圧力を使う。この方法で、1 ~ 2.0 ml/sec のオーダーの透過速度を保證することが出来る。水相分散相が適当な割合で不透明剤を含む時に、押出し処理に続いて 1/1 比の増加がもたらされることはきわめて理解されることである。もしこの相からヨウ素を除いた場合、微小孔の外部の細の内腔への通過により封入されたヨウ素の増加をもたらすことが不可能であることは明らかである。

押し出し速度が微小孔中に封入される溶液の不透明剤の濃度と関連して役割を果たすことは立証されている。従って、もし押し出しを通常温度にて行うならば、1/1 比のいくらかの減少を生じさせることが可能である。逆に、そして付加的な予期しない差を生じさせるべく、リボソーム膜を形成するリン脂質の転移温度より高い温度で進めた場合、この比に増加が觀察される。好ましくは、50° ~ 90℃、例えば約 75℃ の温

度を使う。

懸濁液中に含まれる封入されていないヨウ素の量、即ちリボソームが懸濁されている緩衝化水中に溶解された不透明剤の割合を減少させるために、超音波または攪拌器が有利に使われており、この方法は微小孔自体と前記の水相との間の物理的分離を引き起こす。この分離が達成されたらすぐに、該リボソームを新しい水性分散相に再分散せしめる。この操作を繰り返すことにより、リボソームの損失（各操作で避けられない）が極小にならずに、外部の媒質中の不透明剤の割合を、望んだ量、例えば 2 mg/ml または 0.2 mg/ml のオーダーにさえも減少させることができる。一般に、そのような遠心操作は数千の g、例えば 10,000 ~ 250,000 g の遠心加速度で行われる。常用の技術に従ったマイクロフィルトレーションまたは透析によっても、そのような結果を得ることが出来る。詰められた閉鎖された孔径、例えば 0.1 μm またはそれより大きい孔（前述のマイクロフィルトレーションの場合には、その膜の孔は 0.1 μm より小さい）を有する壁のチューブのセツト中で、処理すべき懸濁液の循環を生ぜしめることにより、マイクロフィルトレーション操作を行うことができる。該フィルトレーションを受けた懸濁液の体積が減少する（該チューブの孔を通るこの懸濁液の通過により）につれて、新しい溶液、例えば緩衝化混合物または生理學上相容される水溶液により置換される。これらの技術を使って、分散液中に含まれる望ましくない物質、特に溶解されたヨウ素の大部分が除去される。さらに、マイクロフィルトレーションは該溶液にお

いて、幾つかの望ましくない溶媒、特にごく小さい孔径水相を除くことを可能にし、これは、1/1 比の改善の効果を有する。

リボソームの外部の懸濁液を構成する媒質として、菊藻系の液体および生存環境と適合する溶液を使うことが可能である。そのような溶液の例として告及されるのは、トリス、リン酸塩等で緩衝化されているかまたは緩衝化されていない、塩溶液、水溶液（中性領域の pH）、および塩、グルコース、不透明剤、緩衝剤等から選ばれた 1 つまたは複数の物質を含む懸濁液である。1 つの典型的な懸濁液（0.8 g/ml）は、グルコース（0.7 M）、NaCl（0.8 %）およびトリス（10 mM）を含有する。

本発明において出発物質として使用され得るリボソーム懸濁液の調整のために、既知の技術、特に前に引用した文献中に記載されているものを利用することができる。

好ましく利用されるのは、R E Y 法 [cf. P. Soka ら、(1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4194] および PP-A-179,669 の明細書中に記載されているものである。

これらの方法の適用により、一般に次のパラメーターを有するリボソームの最初の懸濁液が得られる：緩衝液 0.9 % NaCl, 10 mM Tris, pH 7 ~ 7.5 ;

- 脂質、約 1 % ;
- 全ヨウ素濃度、20 ~ 30 mg/ml ;
- リボソーム内のヨウ素濃度、1 ~ 2 g/g 脂質 (300 g/g のイオパミドール溶液)。

そのような最初の溶液に前述の操作を行うことにより、本発明に係る不透明組成物が得られる。

実験動物への注入による不透明剤としてのその利用の時に、本発明の組成物はその特有の緩衝液および選択性のために、非常に有効であることが示される。特に、肺におけるヨウ素の保持の 30 ~ 40 倍の減少が觀察される。重量で 2.0 % より少ないヨウ素の全量を使う本発明の組成物を用いると、ヨウ素の全体濃度がリボソームの懸濁液の 8.0 重量 % に達するであろう従来技術（例えば、US-A-4,192,856 参照）による懸濁液を用いて得られるものと等価またはより優れた診断結果を得ることができる。

次の実験例が本発明を具体的に説明する。

例 1

まず最初に、クロロホルム 4.2 ml 中にジパルミトイルホスファチジル酸 (DPPA, PLUKA) 5.7 mg およびジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC, PLUKA) 5.43 mg を含む溶液を調製する。この溶液 2.0 ml にクロロホルム 2.0 ml およびジイソプロピルエーテル 4.0 ml を加え、次いで攪拌した後、7.5 % (w/v) メグルミンジアトリゾニート水溶液 1.2 ml、即ちヨウ素化されている不透明剤 (BRACCO) を加える。5.0℃ に加熱され得られたその混合物を、超音波 (Braun Labsonic 1510) に 5 分間かけた。次にそのエマルジョンを、ゲルが得られるまでロータリーエバポレーター中で 4.5℃ にて濃縮した。そのフラスコに 7.0 % メグルミンジアトリゾニート水溶液 約 2 ml および蒸留水 4 ml の混合物を入れ、そして攪拌しな

特表平2-500192(6)

が混濁を認めた。均一混合物を得た後、そこに7.5%メグルミンジアトリゾエート水溶液約2.0mlおよび蒸留水8mlの混合物を再び添加し、そして溶液の最後の粘度を薬液により取り除いた。得られたリボソームの溶液（溶液A）の体積を蒸留水により4.0mlに調整した。

リボソーム内部に効果的に封入されたメグルミンジアトリゾエートの量を決定した。得られた微細製物（5ml）を235,000gで2.5分間遠心した。その小胞を1.0mlの塩溶液（0.9% NaCl, 10mM Tris-HCl, pH7.2）中に取り出し、そして2回当の遠心操作（15分、25,000g）を行った。この遠心に続く懸濁液中への取出しの段階をさらに4回繰り返した。これは封入されなかったメグルミンジアトリゾエートの完全な除去を可能にする。最後の5回中への懸濁の後、得られた微細液のアリコート（0.9ml）を、ドデシル硫酸ナトリウムの1.0%溶液0.1mlに添加し、そして4.0mlで5分間加熱した。この溶液の260nmでの光学濃度を測定することにより、この段階で、最終調製物がml当たり10.4mgのヨウ素に相当する21.4mg/mlのメグルミンジアトリゾエートを含有することが決定された。脂質のロスを確認することにより、この調製物が7.14mg/mlのリン脂質、即ち1.45のヨウ素/リン脂質比を有するであろうことが立証される。

溶液Aの残りを7.5℃に加熱し、次いで1ミクロンの孔径を有するポリカーボネート濾紙(Nuclepore)を通して加熱下において押出した。次いで得られた溶液を周囲温度まで冷却し、そしてその後、前述のような一連の遠心分離に続く懸濁

液中への取出しを行った。5回の洗浄後に得られた上清液の分光光度分析は、0.2mg/mlより低い外部相中の残存ヨウ素濃度を示した。この時点で、リボソームの懸液を全体積7mlの緩衝液中に懸濁した。最終調製物中の全ヨウ素濃度を決定するために、この調製物のアリコート量を、前述のようにドデシル硫酸ナトリウムの存在下4.0mlで5分間インキュベートした。分光光度分析は、最終調製物が、ml当たり62.5mgのヨウ素に相当しそして1.75の1/1比を示す、128.5mg/mlのメグルミンジアトリゾエートを含有することを示した。従って、該押出し法は、封入されたヨウ素の2.0%の増加をもたらした。

例2

ジノプロビルエーテル 100mlに、重量比において次の物質：BPPC3/BPPA1/BSPC1を含有リン脂質の混合物（この混合物は7.1mg/mlの濃度（重量）でクロロホルム中に溶解されている）100mlを添加した。

次いでそこにイオパミドールの63.2%水溶液（ml当たり300mgのヨウ素）3.0mlを添加し、そして全体を超音波を使って5.0'で8分間超音波処理した（BRANSONソニック1510超音波装置）。混濁性の溶液を除去するため、Rotavapor（45°/8mmHg）を使って性状溶液を蒸発せしめた。形成されたゲルを該イオパミドール溶液 100ml中に再び分散させた。次いでこの調製物の試料を、約5barの圧力下で0.8μmまたは2μmの膜（Nuclepore）を通す押出しテストを行った。

様々な押出された調製物又は再押出し調製物を緩衝液

（235,000g；30分）し、その後、破リボソーム小胞を緩衝液溶液（0.9% NaCl, 10mM Tris, pH7.2）中に再分散させた（テスト1および2）。観察によれば、分散相として、イオパミドールに対して等量の溶液、即ち0.7Mグルコース、15mM NaCl, 1mM Trisのものを使った（テスト3）。この相懸液（分散相中に溶解されているヨウ素の除去）を、これらの溶液の1つまたは他のものを使って、ある回数懸濁した。遠心分離を25,000gで1.5分間行い、0.2mg/ml以下の分散相の残存ヨウ素濃度まで下げる。この含量は260nmでの分光光度により測定された。一般に、4またはそれより少ない遠心および再分散工程の数が、所望の純度を達成するのに十分である。

この時点で、例1に記載したようにして、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）でのアリコート量の処理により、封入されたヨウ素の量を決定した：0.1mlの1.0%水性SDSを0.9mlのリボソームの溶液に加え、そしてその混合物を4.0mlで5分間加熱し、次いで分光光度の読みを行う（対照は封入されたヨウ素を有さない同等の試料である）。1μmのヨウ素/ml溶液に相当する光学濃度は、260nmで0.054である。粒子カウンタ（Coulter Nephosizer）により、リボソームの小胞の平均サイズおよびその多分散性を確認した。

その結果を表に示す。テスト1および2は緩衝液中の懸濁液の試料に関し；テスト3はグルコース溶液中の懸濁液に

テスト	膜の孔径 (μm)	小胞の平均 サイズ (nm)	分散度	封入されたヨウ素 (g/g 脂質)
1	最初の状態	610	5	2.23
1 A	2 μm	555	5	2.49
2	最初の状態	662	5	3.02
2 A	1 μm	432	4	3.75
2 B	0.8 μm	468	3	3.91
2 C	0.8 μm (4回押出し)	346	3	2.75
3	最初の状態	519	5	2.61
3 A	2 μm 周囲温度で	708	3	3.12
3 B	2 μm 7.5℃で	883	3	3.96

* このテストでは、押出しは7.5℃の代わりに周囲温度で行った。

この表の結果は、一回の押出し操作が封入されたヨウ素の量における有意な増加および多分散指数Pの減少を導くことを示している。加えて、遠心膜の孔の大きさが減少すると、封入されたヨウ素の1/1比（および小胞の寸法の均質性の程度）が増加する。

別のテストにおいて、封入されたヨウ素の全量を約6mg/ml脂質まで増加せしめることが可能であった。

例3

B. SPONTON (Intera, J. Pharmaceutics (1985) 23, 209)に従って、クロロホルム（42ml）中に543mgのジパルミトイル

特表平2-500192 (7)

ホスファチジルコリン (PLUSA)、57ngのジパルミトイルホスファチジル酸 (FLUKA) および微量の¹⁴C-トリパルミチン (Amersham, 0.1 μ Ci) を含む溶液を調製した。この溶液 1.4 ml を 200 ml のフラスコに入れ、そして部分真空下 2.5 mm でロータリーエバポレーターで蒸発乾燥せしめた。次いでそこに予め約 5.5 mm に加熱したイオパミドール (IRACCO) の 0.1.2% 溶液 (ml 当りヨウ素 300 ng に相当する) 2.5 ml を添加し、そしてその混合物を同温度にて 2 時間インキュベートした。次にこの混合物の連続した 5 回の遠心操作 (1 回目は 285,000 g で 30 分間、次の 4 回は 4 mm において 29,000 g で 30 分間) を行った。これら遠心操作の各回ごとに懸液を塩溶液 (0.9% NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.2) 中に再懸濁した。その後、260 nm で分光光度的に測定し (前の例を参照のこと)、最後の洗浄操作の洗浄水中のイオパミドールの残存濃度、およびドデシル硫酸ナトリウム (SDS) によるリボソーム小胞の破壊後の封入された溶液の濃度を決定した。このようにして、洗浄した洗浄水 ml 当り 0.08 ng のヨウ素、および洗浄された組成物 (25 ml) 中のリボソーム溶液 ml 当り 7.8 ng の封入されたヨウ素が測定された。シンチレーションカウンタ (Beckman LS 8100) を使った最終組成物のアリコート量の分析により (例 4 参照)、該脂質の濃度が 5.2 ng/ml (これは最初の脂質の 6.5% に相当する) であることがわかった。

全体として、ml 当り 7.7 ng の封入されたヨウ素および ml 当り 5.5 ng の脂質 (ヨウ素/リン脂質の比が 1.38) を含む 375 ml の懸濁液を得るように、前述したようなリボソームの調整

を繰り返した。次いでこの調製物をマイクロフィルトレーション・モジュール (タイプ HD 020 CP2M、孔径 0.2 μ m, EXXA, Supperco, German Federal Republic) の助方で 1.5 mm にてダイアフィルトレーションにかけた。膜を通過し懸液中に抽出された液体の体積は、新しい塩溶液 (NaCl 0.9%, Tris-HCl 10 mM, pH 7.2) のリボソーム懸濁液中への添加により連続的に置き換えられる。懸液の 1.5 ml の除去の後、ダイアフィルトレーションされた溶液を濃縮し、これで 9.7 ml のマイクロフィルトレーションされたリボソームを生じ、0.2 μ m よりも小さいサイズの小胞の大部分は除去されている。分析は、この調製物が ml 当り 24.8 ng の封入されたヨウ素および ml 当り 15.4 ng の脂質、即ち 1.52 の封入されたヨウ素/リン脂質の比、を含むことを示す。従って、マイクロフィルトレーションは、封入されたヨウ素/リン脂質の濃度を 1.38 から 1.52 に増加せしめ、すなわち約 9% 増加せしめることを可能にした。

例 4

例 2 に記載した方法により、120 ng の脂質 (DC-95M/DPPA, 重量で 9/1) からリボソームの懸液 (3 パッケージ) を調製した。これらの脂質は、さらに 1.5 μ Ci の¹⁴C-トリパルミチン (放射能トレーサー要素) を含有する。ヨウ素濃度 (300 ng/ml) として使われるのは、8 mM トリス緩衝剤、pH 7.2、10⁻⁷ M EDTA、2 mM ナトリウム塩中 0.1.2% 重量 % のイオパミドールの溶液であり、この溶液を、前もって 0.45 μ m のフィルターを通過して濾過しておく。

前記の成分によって得られたリボソームの懸濁液のうちの

二つを、それぞれ 2.5 mm と 0.8 μ m の孔径を有する膜を通して 7.5 mm にて抽出した。第三の溶液 (溶液) は、抽出しなかった。それぞれ E-2、E-0.8 および T と名づけられた三つの溶液を、例 2 に記載のようにして超遠心により精製し、次いで塩溶液 (0.9% NaCl, 10 mM Tris, pH 7.2) 中に懸濁し、遠心と再懸濁を 4 回繰り返した。このようにして、例 2 に記載した分析により測定すると、それらは、小胞の平均寸法 (多分散度) および脂質 1 ng 当りの封入されたヨウ素の量 (ng) について下記のとおりそれぞれの値で連続して得られる。

T : 321 nm (3) ; 2.39
E-2 : 351 nm (3) ; 2.72
E-0.8 : 323 nm (2) ; 2.53

これらのリボソームを、kg 当り 120 ng のヨウ素の割合で、実験用ラット (SPRAGUE-DAWLEY) の尾の静脈に注射した。注射後 1 時間目に、該動物を殺し、そしてヘパリン処理した試験管に血液を回収し、同様に肝臓および肺臓を回収してこれを乾燥および蒸発後、適切な緩衝液 (PACKARD オキシゲナー) 中で乾燥させた。この乾燥により発生する CO₂ を集め、シンチレーションにより分析した。血液はソルセン (Solusene) /イソプロパノールの 1:1 (v/v) 混合物 (1 ml) 中の溶液 (0.25 ml のアリコート量) にし、そして H₂O (0.5 ml, 32%) による脱色を行った後に分析する。種々の試料を 10 ng の DMSO (シンチレーション液) に加え、そして BECKMAN LS-8100 シンチレーションカウンタを使ってそれらの放射能を測定する。

下表に与えられる結果は、検査中の血液または尿量により保持された進入濃度の百分率として表わされる (各結果は 3 回の測定の前平均である)。

見 本	血	尿	肝	肺
T	1.0	41.5	12.3	
E-2	1.6	43.2	0.5	
E-0.8	1.4	47.0	0.3	

上の結果から、0.8 および 2.5 mm の膜の孔径の範囲に相当する両サイズ境界の間への微小泡の大きさの均一化が、前による該小胞の破壊の相当な減少をもたらすということが立証される。

例 5

例 4 (見本 E-0.8) において記載したようにして、リボソームの懸濁液を調製した。そのような懸濁液の分析は次の値を提供する：

32.5 ng の脂質および 70.2 ng のヨウ素/ml 懸濁液、これは脂質 1 ng 当り封入されたヨウ素 2.16 ng に相当する。

次の段階は、この懸濁液の Sprague-Dawley ラット (各グループ 5 匹ずつの動物) への kg 当り 250 ng のヨウ素の割合における注射であった。

比較のために、リボソーム中に封入されていない同量のヨウ素を対照ラットに注射した。

30 分後、1 時間後、4 時間後および 24 時間後、グループにおいて該動物を殺し、血液を収集し、そしてヘパリン処理した試験管中に保存した。腎臓 (肝臓、脾臓、腎臓および

特表平2-500192(8)

肺)をあらかじめ除去しそして重さを量った。残存血液の量を決定するために、HEIJERら (Clin.Chim.Acta(1992); 1, 638)により記載された方法に従って、これら器官のアリコート盤を7mMアンモニウム(5mM)中でホモジナイズした。

上述した種々の器官により保持されたヨウ素の量を、Crアノードを有する PHILIPS PM 1410 装置、電圧=30kV; 電流=50mAを使ったX線蛍光により測定した。血液含有量について矯正された結果が下表に示され、そして末梢部の動物に関して更なる測定値も示されている。

表
ヨウ素濃度/組織

注射後の 時間(時間)	肝臓	脾臓	腎臓	肺	血液
未処置の 動物	0.12	0.19	0.06	0.12	...
封入されて いない ヨウ素	0.5 1 4 24	190 180 90 1	19 11 8 1.5	530 289 83 0.8	110 48 19 1
封入された ヨウ素	0.5 1 4 24	2400 2100 2200 590	5900 8600 6200 3900	390 280 80 15	300 200 160 60

上の結果は、該リボソームによるヨウ素の授与が肝臓および脾臓によるその保持および腎臓によるその比較的遅い排泄に好都合であることを示している。

本発明により達成される相当な技術的進歩を立証するため、本発明により得られた結果と従来技術に従ったものとを、

並行して示すことが重要となる。

技術的現状を確立するために、導入部において引用したいいくつかの参考文献との参照を行う。問題の比較は表(例)への参照により述べられる。その表の中には、リボソーム懸濁液に固有である一連のパラメーターが並んでいる。参考文献の著者の名が第一列に示されている。

例6

例4(見本E-08)に記載したようにして調製されたリボソームをヨウ素 250mg/kgの投与量においてSprague-Dawleyラットに静脈注射し、これを注射の前後に肝臓のコンピュータ化された断層X線撮影器にかけた。

Siemens Somatom 2断層X線撮影器を使用し、検査は次の条件のもとで行った:

- 256x256 のマトリックス
- 視野 14 cm
- 検査される像の厚さ 2 mm
- スキャン時間 5 秒
- X線: 125kV, 4mA, 230

リボソームの懸濁液の注射前、次いで注射の5'、10'、15'、30'、60'、90'、2時間、3時間および4時間後に像を記録した。ハンスフィールド単位(HU)で表わされる、肝臓のコントラストにおいて増加が観察され、この増加は30分～4時間の期間の間に50%～130%であった。

上記の例において開示された技術において、リボソーム小胞を調製するためにDPPAの代わりにジセチルホスフェート

(HCP)またはジバシトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)を使用しても、同様の結果が観察されるということに注目すべきである。

表
X線に対する不透明剤を含有するリボソームの特性

発明者	脂質	不透明剤 (mg/g)	ヨウ素濃度/ 組織(%)	封入率 (%)
HAVERONら	ダイズのレシチン/ コレステロール/ ステアリン酸アミン	ジアトリゾエート (376)	0.14	0.4
RYAN(1)ら	ホスファチジル コレステロール	ジアトリゾエート (146)	0.5	6.2
ZELTZERら	レシチン/ コレステロール/ ステアリン酸アミン	イオセファノート
RYAN(2)ら	ホスファチジル コレステロール	ジアトリゾエート	0.4
ROZENBERGら	1.5
BENITAら	ダイズのレシチン/ コレステロール	0.2	2.7
CHENGら	卵のレシチン/ ホスファチジル/ コレステロール/ コレステロール	イオセパノール (+他)	0.25	0.6
ZALUTSKYら	レシチン/ コレステロール/ ステアリン酸アミン	ジアトリゾエート または イオセパノール
本発明 (実施例 のタイプ)	PC-BPPG (ダイズのレシチン)	イオセパノール (368)	3-4	7-12

国際調査報告

国際調査報告 No. 80T/EP 68/00447

IPC 4. A 61 K 9/201 A 61 K 49/04

1. 出願の要約

2. 出願の要約

3. 出願の要約

4. 出願の要約

5. 出願の要約

6. 出願の要約

7. 出願の要約

8. 出願の要約

9. 出願の要約

10. 出願の要約

11. 出願の要約

12. 出願の要約

13. 出願の要約

14. 出願の要約

15. 出願の要約

16. 出願の要約

17. 出願の要約

18. 出願の要約

19. 出願の要約

20. 出願の要約

21. 出願の要約

22. 出願の要約

23. 出願の要約

24. 出願の要約

25. 出願の要約

26. 出願の要約

27. 出願の要約

28. 出願の要約

29. 出願の要約

30. 出願の要約

31. 出願の要約

32. 出願の要約

33. 出願の要約

34. 出願の要約

35. 出願の要約

36. 出願の要約

37. 出願の要約

38. 出願の要約

39. 出願の要約

40. 出願の要約

41. 出願の要約

42. 出願の要約

43. 出願の要約

44. 出願の要約

45. 出願の要約

46. 出願の要約

47. 出願の要約

48. 出願の要約

49. 出願の要約

50. 出願の要約

51. 出願の要約

52. 出願の要約

53. 出願の要約

54. 出願の要約

55. 出願の要約

56. 出願の要約

57. 出願の要約

58. 出願の要約

59. 出願の要約

60. 出願の要約

61. 出願の要約

62. 出願の要約

63. 出願の要約

64. 出願の要約

65. 出願の要約

66. 出願の要約

67. 出願の要約

68. 出願の要約

69. 出願の要約

70. 出願の要約

71. 出願の要約

72. 出願の要約

73. 出願の要約

74. 出願の要約

75. 出願の要約

76. 出願の要約

77. 出願の要約

78. 出願の要約

79. 出願の要約

80. 出願の要約

81. 出願の要約

82. 出願の要約

83. 出願の要約

84. 出願の要約

85. 出願の要約

86. 出願の要約

87. 出願の要約

88. 出願の要約

89. 出願の要約

90. 出願の要約

91. 出願の要約

92. 出願の要約

93. 出願の要約

94. 出願の要約

95. 出願の要約

96. 出願の要約

97. 出願の要約

98. 出願の要約

99. 出願の要約

100. 出願の要約

101. 出願の要約

102. 出願の要約

103. 出願の要約

104. 出願の要約

105. 出願の要約

106. 出願の要約

107. 出願の要約

108. 出願の要約

109. 出願の要約

110. 出願の要約

111. 出願の要約

112. 出願の要約

113. 出願の要約

114. 出願の要約

115. 出願の要約

116. 出願の要約

117. 出願の要約

118. 出願の要約

119. 出願の要約

120. 出願の要約

121. 出願の要約

122. 出願の要約

123. 出願の要約

124. 出願の要約

125. 出願の要約

126. 出願の要約

127. 出願の要約

128. 出願の要約

129. 出願の要約

130. 出願の要約

131. 出願の要約

132. 出願の要約

133. 出願の要約

134. 出願の要約

135. 出願の要約

136. 出願の要約

137. 出願の要約

138. 出願の要約

139. 出願の要約

140. 出願の要約

141. 出願の要約

142. 出願の要約

143. 出願の要約

144. 出願の要約

145. 出願の要約

146. 出願の要約

147. 出願の要約

148. 出願の要約

149. 出願の要約

150. 出願の要約

151. 出願の要約

152. 出願の要約

153. 出願の要約

154. 出願の要約

155. 出願の要約

156. 出願の要約

157. 出願の要約

158. 出願の要約

159. 出願の要約

160. 出願の要約

161. 出願の要約

162. 出願の要約

163. 出願の要約

164. 出願の要約

165. 出願の要約

166. 出願の要約

167. 出願の要約

168. 出願の要約

169. 出願の要約

170. 出願の要約

171. 出願の要約

172. 出願の要約

173. 出願の要約

174. 出願の要約

175. 出願の要約

176. 出願の要約

177. 出願の要約

178. 出願の要約

179. 出願の要約

180. 出願の要約

181. 出願の要約

182. 出願の要約

183. 出願の要約

184. 出願の要約

185. 出願の要約

186. 出願の要約

187. 出願の要約

188. 出願の要約

189. 出願の要約

190. 出願の要約

191. 出願の要約

192. 出願の要約

193. 出願の要約

194. 出願の要約

195. 出願の要約

196. 出願の要約

197. 出願の要約

198. 出願の要約

199. 出願の要約

200. 出願の要約

201. 出願の要約

202. 出願の要約

203. 出願の要約

204. 出願の要約

205. 出願の要約

206. 出願の要約

207. 出願の要約

208. 出願の要約

209. 出願の要約

210. 出願の要約

211. 出願の要約

212. 出願の要約

213. 出願の要約

214. 出願の要約

215. 出願の要約

216. 出願の要約

217. 出願の要約

218. 出願の要約

219. 出願の要約

220. 出願の要約

221. 出願の要約

222. 出願の要約

223. 出願の要約

224. 出願の要約

225. 出願の要約

226. 出願の要約

227. 出願の要約

228. 出願の要約

229. 出願の要約

230. 出願の要約

231. 出願の要約

232. 出願の要約

233. 出願の要約

234. 出願の要約

235. 出願の要約

236. 出願の要約

237. 出願の要約

238. 出願の要約

239. 出願の要約

240. 出願の要約

241. 出願の要約

242. 出願の要約

243. 出願の要約

244. 出願の要約

245. 出願の要約

246. 出願の要約

247. 出願の要約

248. 出願の要約

249. 出願の要約

250. 出願の要約

251. 出願の要約

252. 出願の要約

253. 出願の要約

254. 出願の要約

255. 出願の要約

256. 出願の要約

257. 出願の要約

258. 出願の要約

259. 出願の要約

260. 出願の要約

261. 出願の要約

262. 出願の要約

263. 出願の要約

264. 出願の要約

265. 出願の要約

266. 出願の要約

267. 出願の要約

268. 出願の要約

269. 出願の要約

270. 出願の要約

271. 出願の要約

272. 出願の要約

273. 出願の要約

274. 出願の要約

275. 出願の要約

276. 出願の要約

277. 出願の要約

278. 出願の要約

279. 出願の要約

280. 出願の要約

281. 出願の要約

282. 出願の要約

283. 出願の要約

284. 出願の要約

285. 出願の要約

286. 出願の要約

287. 出願の要約

288. 出願の要約

289. 出願の要約

290. 出願の要約

291. 出願の要約

292. 出願の要約

293. 出願の要約

294. 出願の要約

295. 出願の要約

296. 出願の要約

297. 出願の要約

298. 出願の要約

299. 出願の要約

300. 出願の要約

301. 出願の要約

302. 出願の要約

303. 出願の要約

304. 出願の要約

305. 出願の要約

306. 出願の要約

307. 出願の要約

308. 出願の要約

309. 出願の要約

310. 出願の要約

311. 出願の要約

312. 出願の要約

313. 出願の要約

314. 出願の要約

315. 出願の要約

316. 出願の要約

317. 出願の要約

318. 出願の要約

319. 出願の要約

320. 出願の要約

321. 出願の要約

322. 出願の要約

323. 出願の要約

324. 出願の要約

325. 出願の要約

326. 出願の要約

327. 出願の要約

328. 出願の要約

329. 出願の要約

330. 出願の要約

331. 出願の要約

332. 出願の要約

333. 出願の要約

334. 出願の要約

335. 出願の要約

336. 出願の要約

337. 出願の要約

338. 出願の要約

339. 出願の要約

340. 出願の要約

341. 出願の要約

342. 出願の要約

343. 出願の要約

344. 出願の要約

345. 出願の要約

346. 出願の要約

347. 出願の要約

348. 出願の要約

349. 出願の要約

350. 出願の要約

351. 出願の要約

352. 出願の要約

353. 出願の要約

354. 出願の要約

355. 出願の要約

356. 出願の要約

357. 出願の要約

358. 出願の要約

359. 出願の要約

360. 出願の要約

361. 出願の要約

362. 出願の要約

363. 出願の要約

364. 出願の要約

365. 出願の要約

366. 出願の要約

367. 出願の要約

368. 出願の要約

369. 出願の要約

370. 出願の要約

371. 出願の要約

372. 出願の要約

373. 出願の要約

374. 出願の要約

375. 出願の要約

376. 出願の要約

377. 出願の要約

378. 出願の要約

379. 出願の要約

380. 出願の要約

381. 出願の要約

382. 出願の要約

383. 出願の要約

384. 出願の要約

385. 出願の要約

386. 出願の要約

387. 出願の要約

388. 出願の要約

389. 出願の要約

390. 出願の要約

391. 出願の要約

392. 出願の要約

393. 出願の要約

394. 出願の要約

395. 出願の要約

396. 出願の要約

397. 出願の要約

398. 出願の要約

399. 出願の要約

400. 出願の要約

401. 出願の要約

402. 出願の要約

403. 出願の要約

404. 出願の要約

405. 出願の要約

406. 出願の要約

407. 出願の要約

408. 出願の要約

409. 出願の要約

410. 出願の要約

411. 出願の要約

412. 出願の要約

413. 出願の要約

414. 出願の要約

415. 出願の要約

416. 出願の要約

417. 出願の要約

418. 出願の要約

419. 出願の要約

420. 出願の要約

421. 出願の要約

422. 出願の要約

423. 出願の要約

424. 出願の要約

425. 出願の要約

426. 出願の要約

427. 出願の要約

428. 出願の要約

429. 出願の要約

430. 出願の要約

431. 出願の要約

432. 出願の要約

433. 出願の要約

434. 出願の要約

435. 出願の要約

436. 出願の要約

437. 出願の要約

438. 出願の要約

439. 出願の要約

440. 出願の要約

441. 出願の要約

442. 出願の要約

443. 出願の要約

444. 出願の要約

445. 出願の要約

446. 出願の要約

447. 出願の要約

448. 出願の要約

449. 出願の要約

450. 出願の要約

451. 出願の要約

452. 出願の要約

453. 出願の要約

454. 出願の要約

455. 出願の要約

456. 出願の要約

457. 出願の要約

458. 出願の要約

459. 出願の要約

460. 出願の要約

461. 出願の要約

462. 出願の要約

463. 出願の要約

464. 出願の要約

465. 出願の要約

466. 出願の要約

467. 出願の要約

468. 出願の要約

469. 出願の要約

470. 出願の要約

471. 出願の要約

472. 出願の要約

473. 出願の要約

474. 出願の要約

475. 出願の要約

476. 出願の要約

477. 出願の要約

478. 出願の要約

479. 出願の要約

480. 出願の要約

481. 出願の要約

482. 出願の要約

483. 出願の要約

484. 出願の要約

485. 出願の要約

486. 出願の要約

487. 出願の要約

488. 出願の要約

489. 出願の要約

490. 出願の要約

491. 出願の要約

492. 出願の要約

493. 出願の要約

494. 出願の要約

495. 出願の要約

496. 出願の要約

497. 出願の要約

498. 出願の要約

499. 出願の要約

500. 出願の要約

501. 出願の要約

502. 出願の要約

503. 出願の要約

504. 出願の要約

505. 出願の要約

506. 出願の要約

507. 出願の要約

508. 出願の要約

509. 出願の要約

510. 出願の要約

511. 出願の要約

512. 出願の要約

513. 出願の要約

514. 出願の要約

515. 出願の要約

516. 出願の要約

517. 出願の要約

518. 出願の要約

519. 出願の要約

520. 出願の要約

521. 出願の要約

522. 出願の要約

523. 出願の要約

524. 出願の要約

525. 出願の要約

526. 出願の要約

527. 出願の要約

528. 出願の要約

529. 出願の要約

530. 出願の要約

531. 出願の要約

532. 出願の要約

533. 出願の要約

534. 出願の要約

535. 出願の要約

536. 出願の要約

537. 出願の要約

538. 出願の要約

539. 出願の要約

540. 出願の要約

541. 出願の要約

542. 出願の要約

543. 出願の要約

544. 出願の要約

545. 出願の要約

546. 出願の要約

547. 出願の要約

548. 出願の要約

549. 出願の要約

550. 出願の要約

551. 出願の要約

552. 出願の要約

553. 出願の要約

554. 出願の要約

555. 出願の要約

556. 出願の要約

557. 出願の要約

558. 出願の要約

559. 出願の要約

560. 出願の要約

561. 出願の要約

562. 出願の要約

563. 出願の要約

564. 出願の要約

565. 出願の要約

566. 出願の要約

567. 出願の要約

568. 出願の要約

569. 出願の要約

570. 出願の要約

571. 出願の要約

572. 出願の要約

573. 出願の要約

574. 出願の要約

575. 出願の要約

576. 出願の要約

577. 出願の要約

578. 出願の要約

579. 出願の要約

580. 出願の要約

581. 出願の要約

582. 出願の要約

583. 出願の要約

584. 出願の要約

585. 出願の要約

586. 出願の要約

587. 出願の要約

588. 出願の要約

589. 出願の要約

590. 出願の要約

591. 出願の要約

592. 出願の要約

593. 出願の要約

594. 出願の要約

595. 出願の要約

596. 出願の要約

597. 出願の要約

598. 出願の要約

599. 出願の要約

600. 出願の要約

601. 出願の要約

602. 出願の要約

603. 出願の要約

604. 出願の要約

605. 出願の要約

606. 出願の要約

607. 出願の要約

608. 出願の要約

609. 出願の要約

610. 出願の要約

611. 出願の要約

612. 出願の要約

613. 出願の要約

614. 出願の要約

615. 出願の要約

616. 出願の要約

617. 出願の要約

618. 出願の要約

619. 出願の要約

620. 出願の要約

621. 出願の要約

622. 出願の要約

623. 出願の要約

624. 出願の要約

625. 出願の要約</

國際翻譯組織

EP 8510447
SA 22816

This document contains neither recommendations nor conclusions of the FBI. It is the property of the FBI and is loaned to your agency; it and its contents are not to be distributed outside your agency.

[illegible]

For more information, visit www.pearsoncmg.com or call 1-800-818-7243.

第1頁の続き

②発	明	著	トウルニエ	エルベ
②発	明	著	グミ	メルナール

フランス国、エフ・74520 バレリ、リュ ドウ リオンデ、300
スイス国、ツエーバー・1227 カルージュ、シエマン ジル ビユ
27